

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/13946 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/415**,
A61K 39/36, G01N 33/68

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter
Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/08059**

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. August 2000 (18.08.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SUCK, Roland**
[DE/DE]; Mühlenkamp 19, D-22303 Hamburg (DE).
CROMWELL, Oliver [DE/DE]; Loenshöhe 2, D-21465
Wentorf (DE). **FIEBIG, Helmut** [DE/DE]; Bäckerweg
10, D-21493 Schwarzenbek (DE).

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(74) Gemeinsamer Vertreter: **MERCK PATENT GMBH**;
Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).

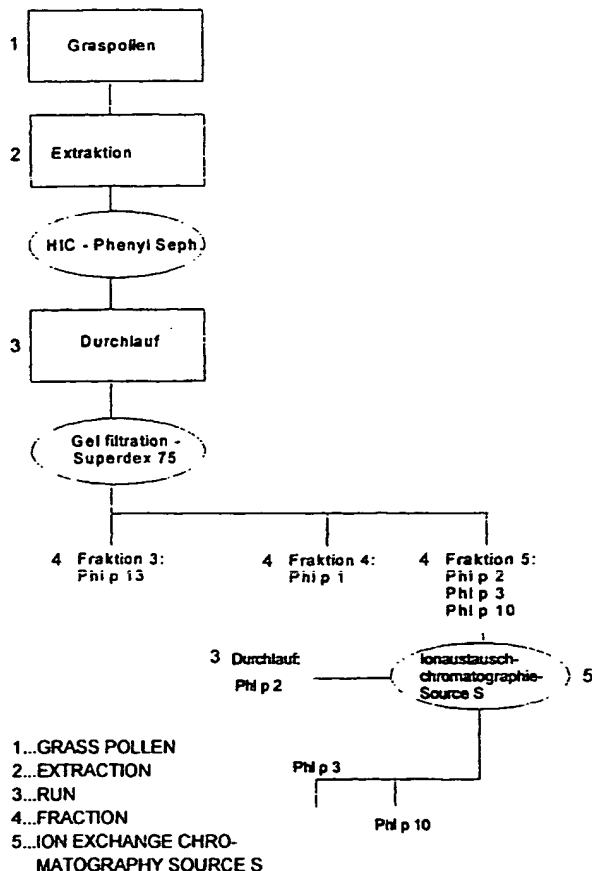
(30) Angaben zur Priorität:
199 39 982.4 24. August 1999 (24.08.1999) **DE**

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AL, AM, AT, AU,**
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **METHOD FOR ISOLATING AND PURIFYING GRASS POLLEN ALLERGENS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON GRÄSERPOLLENALLERGENEN**



(57) Abstract: The invention relates to a method for quickly and effectively isolating and purifying five, namely the group 1, 2, 3, 10 and 13 allergens from grass pollen. The purification of said grass pollen is based on the inventive combination of hydrophobic interaction chromatography, gel filtration and cation exchange chromatography. The proteins obtained by the inventive method facilitate an improved diagnosis of pollen allergies and are used in pharmaceutical preparations for the therapy of pollenogenic diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur schnellen und effektiven Isolierung und Reinigung von fünf Allergenen der Gruppen 1, 2, 3, 10 und 13 aus Gräserpollen. Die Aufreinigung basiert auf einer erfindungsgemäßen Kombination von Hydrophober-Interaktionschromatographie, Gelfiltration und Kationaustauschchromatographie. Die so erhaltenen Proteine können zur verbesserten Diagnostik von Pollenallergien sowie für pharmazeutische Zubereitungen für die Therapie von pollenallergischen Krankheiten verwendet werden.

WO 01/13946 A3

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/13946 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 39/36**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/08059**

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. August 2000 (18.08.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 39 982.4 24. August 1999 (24.08.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **MERCK PATENT GMBH [DE/DE];** Frankfurter
Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SUCK, Roland**
[DE/DE]; Mühlenkamp 19, D-22303 Hamburg (DE).
CROMWELL, Oliver [DE/DE]; Loenshöhe 2, D-21465
Wentorf (DE). **FIEBIG, Helmut [DE/DE];** Bäckerweg
10, D-21493 Schwarzenbek (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **MERCK PATENT GMBH;**
Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD FOR ISOLATING AND PURIFYING GRASS POLLEN ALLERGENS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON GRÄSERPOLLENALLERGENEN**

(57) Abstract: The invention relates to a method for quickly and effectively isolating and purifying five, namely the group 1, 2, 3, 10 and 13 allergens from grass pollen. The purification of said grass pollen is based on the inventive combination of hydrophobic interaction chromatography, gel filtration and cation exchange chromatography. The proteins obtained by the inventive method facilitate an improved diagnosis of pollen allergies and are used in pharmaceutical preparations for the therapy of pollenogenic diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur schnellen und effektiven Isolierung und Reinigung von fünf Allergenen der Gruppen 1, 2, 3, 10 und 13 aus Gräserpollen. Die Aufreinigung basiert auf einer erfindungsgemäßen Kombination von Hydrophober-Interaktionschromatographie, Gelfiltration und Kationaustauschchromatographie. Die so erhaltenen Proteine können zur verbesserten Diagnostik von Pollenallergien sowie für pharmazeutische Zubereitungen für die Therapie von pollenallergischen Krankheiten verwendet werden.

WO 01/13946 A2



1

2

Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von Gräserpollenallergenen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur schnellen und effektiven Isolierung und
5 Reinigung von fünf Allergenen der Gruppen 1, 2, 3, 10 und 13 aus Gräserpollen.
Als natürlicher Rohstoff für die Allergenreinigung dienen die Pollen von Süßgrä-
sern, wie z.B. von *Phleum pratense*. Die Aufreinigung basiert auf einer erfin-
dungsgemäßen Kombination von hydrophober Interaktionschromatographie,
Gelfiltration und Kationaustauschchromatographie. Die so erhaltenen Proteine
10 können zur verbesserten Diagnostik von Pollenallergien sowie für pharmazeuti-
sche Zubereitungen für die Therapie von pollenallergischen Krankheiten verwen-
det werden.

Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 20% der Bevölkerung in
15 industrialisierten Ländern leiden unter Beschwerden wie allergischer Rhinitis,
Konjunktivitis oder Bronchialasthma, die durch in der Luft befindliche Allergene
(Aeroallergene), die von unterschiedlichen Quellen wie Pflanzen, Milben, Katzen
oder Hunden freigesetzt werden, hervorgerufen werden. Bis zu 40% dieser Typ
1-Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE-Reaktivität mit Allergenen aus Grä-
20 serpollen (Freidhoff et al., 1986, J Allergy Clin Immunol 78, 1190-201).

Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um Proteine,
Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach Aufnahme über
die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an der Oberfläche von
25 Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei oder mehr IgE-Moleküle
durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur Ausschüttung von Mediato-
ren (z.B. Histamin, Prostaglandinen) und Zytokinen durch die Effektorzelle und
damit zu den entsprechenden klinischen Symptomen.

30 In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit der Allergiker, die IgE-Antikörper ge-
gen bestimmte Allergene aufweisen, wird zwischen Major- und Minorallergenen
unterschieden. Im Fall vom Lieschgras (*Phleum pratense*) sind bislang Phi p 1
(Petersen et al., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92, 789-796), Phi p 5 (Matthiesen

und Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21, 297-307; Petersen et al., 1992), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54) und Phl p 2/3 (Dolecek et al., 1993) als Majorallergene und Phl p 4 (Löwenstein, 1978, Prog. Allergy 25, 1-62) sowie Gruppe 10 und 11 aus *Lolium perenne* (Ansari et al., 1987, J. Allergy Clin. Immunol. 80, 229-235) als Minorallergene charakterisiert worden. Außerdem ist kürzlich ein weiteres hochmolekulares Majorallergen beschrieben worden, das als Phl p 13 bezeichnet wurde. Die Allergene der Gruppe 1 und 13 sind glykosyliert.

- 10 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind die Allergengruppen 1, 2, 3, 10 und 13 von besonderer Bedeutung. Etablierte Reinigungsmethoden der natürlichen Allergene basieren auf der Isolierung von jeweils einzelnen Proteinen. Mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von spezifischen Antikörpern sind z.B. bisher Gruppe 1 Allergene aus *Lolium perenne* (Boutin et al., 1996, Int. Arch. Allergy Immunol. 112, 218-225) und *Phleum pratense* (Grobe et al., 1999, Eur. J. Biochem. 263, 33-40) gereinigt worden. Diese Methode ist hinsichtlich ihrer Kapazität begrenzt und wird unter Verwendung extremen pH durchgeführt, so daß der Erhalt der nativen Konformation nicht sichergestellt werden kann. Andere Verfahren basieren auf verschiedenen mehrstufigen Abfolgen chromatographischer Schritte. Dabei werden jeweils individuelle Allergene erhalten, wie z.B. Gruppe 10 (Ansari et al., 1987, J Allergy Clin Immunol 80, 229-235) oder Gruppe 3 (Ansari et al., 1989, Biochemistry 28, 8665-8670). Andere Allergene gehen bei diesen Methoden verloren oder sind nicht rein darzustellen.
- 25 DNA-Sequenzdaten liegen u.a. von Phl p 1 (Laffer et al., 1994, J. Allergy Clin. Immunol. 94, 1190-98; Petersen et al., 1995, J. Allergy Clin. Immunol. 95(5). 987-994), Phl p 5 (Vrtala et al., 1993, J. Immunol. 151 (9), 4773-4781), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108 (1), 55-59) und Phl p 2 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335 (3), 299-304) vor. Mit Hilfe von cDNA-Sequenzen ist es
- 30 möglich, rekombinante Allergene herzustellen, die in der Diagnostik und Therapie Verwendung finden können (Scheiner and Kraft, 1995, Allergy 50, 384-391).

Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6), 336-339; Bousquet et al., 1998, J. Allergy Clin Immunol. 102 (4), 558-562). Dabei werden dem Patienten natürliche Allergenextrakte in steigenden
5 Dosen subkutan injiziert. Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen oder sogar eines anaphylaktischen Schocks. Um diese Risiken zu minimieren werden innovative Präparate in Form von Allergoiden eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergenextrakte, die deutlich reduzierte IgE-Reaktivität, jedoch identische T-Zell-Reaktivität im Ver-
10 gleich zum nicht behandelten Extrakt aufweisen (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7), 377-382).

Eine weitergehende Therapieoptimierung wäre mit hochgereinigten Allergenen möglich. Definierte Cocktails aus natürlichen Allergenen können die bisherigen
15 Extrakte ablösen, da diese außer den verschiedenen Allergenen eine größere Zahl von immunogenen, aber nicht allergenen Begleitproteinen, die für die spezifische Immuntherapie nicht notwendig sind, enthalten. Die Verwendung von Allergen- Cocktails läßt auch die Bereitung von patientenspezifischen Allergenmischungen entsprechend des Sensibilisierungsspektrums zu. Realistische Per-
20 spektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit hochreinen natürlichen Allergenen führen können, bieten modifizierte Allergene, bei denen IgE-Epitope durch irreversible Modifikation der Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört werden, ohne die für die Therapie essentiellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen.

25 Die Erfindung kann ebenso in der In-vitro- und In-vivo-Diagnostik von allergischen Erkrankungen, speziell der Pollinosis, vorteilhaft angewendet werden. Dazu werden die gereinigten Allergengruppen zur Detektion von IgE-Antikörpern in etablierten Verfahren eingesetzt.

30 Bei der Erfindung handelt es sich um ein biochemisches Reinigungsverfahren, das über eine effiziente Drei-Stufen-Reinigung zur Isolierung von 4 Majorallergenen und 1 Minorallergen aus wässrigen Kurzzeitpollenextrakten führt. Als natürlicher Rohstoff dienen Pollen der Graminaen, wie z.B. *Phleum pratense*, *Lolium*

perenne, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus* u.a. Abb. 1 gibt das Aufreinigungsschema der 5 genannten Allergene aus Graspollenextrakten wieder. Dabei entsprechen die Allergenbezeichnungen Phl p 1 bis Phl p 13 den ansonsten im Text verwendeten Bezeichnungen Allergenen 1 bis 13.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Gewinnung von im wesentlich reinen Gras-Allergenen der Gruppen 1, 2, 3, 10, 13, worin ein wäßriger Extrakt von Pollen der Graminaen hergestellt wird, und die löslichen Bestandteile einer hydrophoben Interaktionchromatographie, einem Gelfiltrations-Schritt und gegebenenfalls einer Kationenaustauscherchromatographie unterzogen werden.

Erfindungsgemäß können auch mehrere Schritte einer Chromatographie-Art durchgeführt werden, in der Regel ist das Verfahren aber so effektiv, daß jeweils ein Trennungsschritt ausreicht.

Das Verfahren eignet sich in besonderer Weise für die Gewinnung besagter Allergene aus den Pollen der Spezies *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Holcus lanatus*, *Poa pratensis*, *Secale cereale*.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante erfolgt die Extraktion mittels Tris/HCl-gepufferter wäßriger Lösung. Es sind jedoch erfindungsgemäß auch andere bekannte wäßrige Pufferlösungen einsetzbar.

Für die Aufreinigung der genannten Allergene werden die löslichen Bestandteile des Extraktes eingesetzt. Hierzu wird der Extrakt 3 bis 8 Minuten, vorzugsweise 5 Minuten bei 18.000 bis 30.000 x g zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Aufreinigung hergenommen. Alternativ kann auch eine Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch andere Methoden, beispielsweise durch Filtration erfolgen.

Der erste chromatographische Aufreinigungsschritt erfolgt mittels hydrophober Interaktions-Chromatographie, beispielsweise an Sepharose®. Hierbei werden

viele Verunreinigungen auf dem Träger festgehalten, während die gewünschten Allergene sich im Durchlauf befinden. Entsprechende andere Trägermaterialien können ebenfalls eingesetzt werden.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist somit ein entsprechendes Verfahren, worin mittels hydrophober Interaktions-Chromatographie die Gras-Allergene der Gruppen 1, 2, 3, 10, 13 von anderen Bestandteilen abgetrennt werden.

10 Im nachfolgenden Aufreinigungsschritt werden die Gras-Allergene in drei Fraktionen getrennt, wobei die Gruppen 1, 13 jeweils eine Fraktion und die Gruppen 2, 3 und 10 die dritte Fraktion darstellen. Gegenstand der Erfindung ist somit im speziellen ein Verfahren, worin die Allergene der Gruppe 1 und 13 durch einen nachgeschalteten Gelfiltrations-Schritt in separaten Fraktionen erhalten und von den Allergenen der Gruppe 2, 3, und 10 abgetrennt werden.

15

Letztere können dann erfindungsgemäß durch einen nachfolgenden Chromatographieschritt über einen Kationenaustauscher voneinander getrennt werden. Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren, worin die nach dem Gelfiltrations-Schritt erhaltenen Allergene der Gruppe 2, 3 und 10 durch eine nachgeschaltete Kationenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden.

20

Die Identifikation der genannten an sich bekannten Allergene erfolgt entweder über ihre bekannten unterschiedlichen physikalischen, chemischen, biologischen oder immunologischen Eigenschaften, insbesondere mittels isoelektrischer Fokussierung, UV-Absorptionsmessungen, SDS-PAGE und spezifischer Antikörper. Diese Verfahren und Techniken sind bekannt und allgemein beschrieben.

25

Die Ausbeute der erfindungsgemäß gewonnenen Allergene beträgt 0,5 – 1,5% bezogen auf das ursprünglich eingesetzte Gesamtprotein der Graspollen.

30

Die Erfindung dient auch zur Verbesserung der In-vivo- und In-vitro-Diagnostik im Rahmen einer Allergen-Komponenten auflösenden Identifizierung des patientenspezifischen Sensibilisierungsspektrums. Gegenstand der Erfindung ist somit

Verfahren zur Diagnose von Pollenallergien in vivo und in vitro unter Verwendung der gemäß der Ansprüche 1 bis 6 gewonnen Allergene.

Die Erfindung dient ebenfalls zur Herstellung von verbesserten Präparaten zur spezifischen Immuntherapie von Gräserpollenallergien, was durch Abtrennung von immunogenen, aber für die Therapie irrelevanten Extraktbestandteilen erreicht wird. Weiterhin kann durch die chemische Umsetzung der gereinigten Allergene ein Allergoidpräparat erhalten werden. Gegenstand der Erfindung ist somit auch eine pharmazeutische Zubereitung, welche ein oder mehrere nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Allergene sowie ggf. entsprechende Hilfs- und Trägerstoffe enthält.

Im nachfolgenden wird das Verfahren im Detail beschrieben:

Die Reinigung der natürlichen Allergene aus Lieschgraspollen wird in einem Dreischrittverfahren durchgeführt (siehe Abb. 1). Nach der wässrigen Extraktion mit Tris/HCl-gepufferter Lösung (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) von Pollen über 30 Minuten wird der Extrakt durch Zentrifugation, vorzugsweise bei 20.000 x g fünf Minuten lang, separiert. Der Tris/HCl-gepufferte (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) Überstand wird mit 1 M Ammoniumsulfat versetzt und anschließend einer Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie (Phenyl-Sepharose High Performance, Pharmacia) unterzogen. Eine typische Säule ist mit 50 bis 100 ml des Trägermaterials gepackt und wird mit einer Flußrate von etwa 5 ml / min betrieben. Die Durchlaufraction enthält ausschließlich die Proteine von fünf Allergengruppen: Gruppe 1 (30-35 kDa), Gruppe 2 (11 kDa), Gruppe 3 (12 kDa), Gruppe 10 (13 kDa) und Gruppe 13 (55-60 kDa). Es folgt eine Einengung des Volumens vorzugsweise durch Ultrafiltration oder Lyophilisation.

In einem zweiten Schritt werden die Allergene der Gruppen 13 und 1 dann durch Gelfiltration entsprechend ihrer unterschiedlichen Molekularmassen mit Superdex® 75 prep grade (Pharmacia) oder ähnlichen bekannte für diese Zwecke geeignete Trägermaterialien von den niedermolekularen Allergenen getrennt. Das Elutionsmedium ist vorzugsweise 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat. Die

Säule wird mit einer Flußrate von etwa 5 ml/min betrieben. Man erhält drei Fraktionen, welche die Allergene 1, 13 (jeweils getrennt) und 2, 3, 10 (in einer Fraktion) enthalten.

- 5 Die niedermolekularen Allergene der Gruppen 2, 3 und 10, welche zusammen in der dritten Fraktion der Gelfiltration eluiert wurden, werden mittels Kationenaustauschchromatographie voneinander getrennt. Hierzu wird die lyophilisierte Probe in einen wäßrigen Puffer, vorzugsweise 20 mM Phosphatpuffer, pH 7.2 aufgenommen und auf eine mit diesem Puffer äquilibrierte Kationenaustauscher-Säule
- 10 (z.B. Source S ®) aufgetragen. Im Durchlauf findet man das saure Allergen 2. Durch einen Salzgradienten von 0 – 500 mM NaCl über etwa 20 Säulenvolumina werden die gebundenen Allergene 3 und 10 nacheinander eluiert. Damit ist die niedermolekulare Allergengruppe in ihre Einzelallergene separiert. Auch andere Kationenaustauschermaterialien können erfindungsgemäß eingesetzt werden.

15

- Die vorliegende Erfindung ermöglicht also durch das zur Verfügung gestellte erfindungsgemäße Verfahren, welches sich durch die spezielle Abfolge der Chromatographieschritte sowie die Wahl der Chromatographiemedien auszeichnet, eine hochskalierbare, technologisch umsetzbare Produktionsmethode zur Gewinnung von mehreren hochreinen, natürlichen Gräser-Allergenen mit geringem
- 20 Arbeits- und Zeitaufwand. Da die angewendeten Reinigungsverfahren sehr schonend für Proteine sind, bleiben deren Konformationen und Antigenität erhalten. Dies ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Diagnostik von allergischen Erkrankungen.

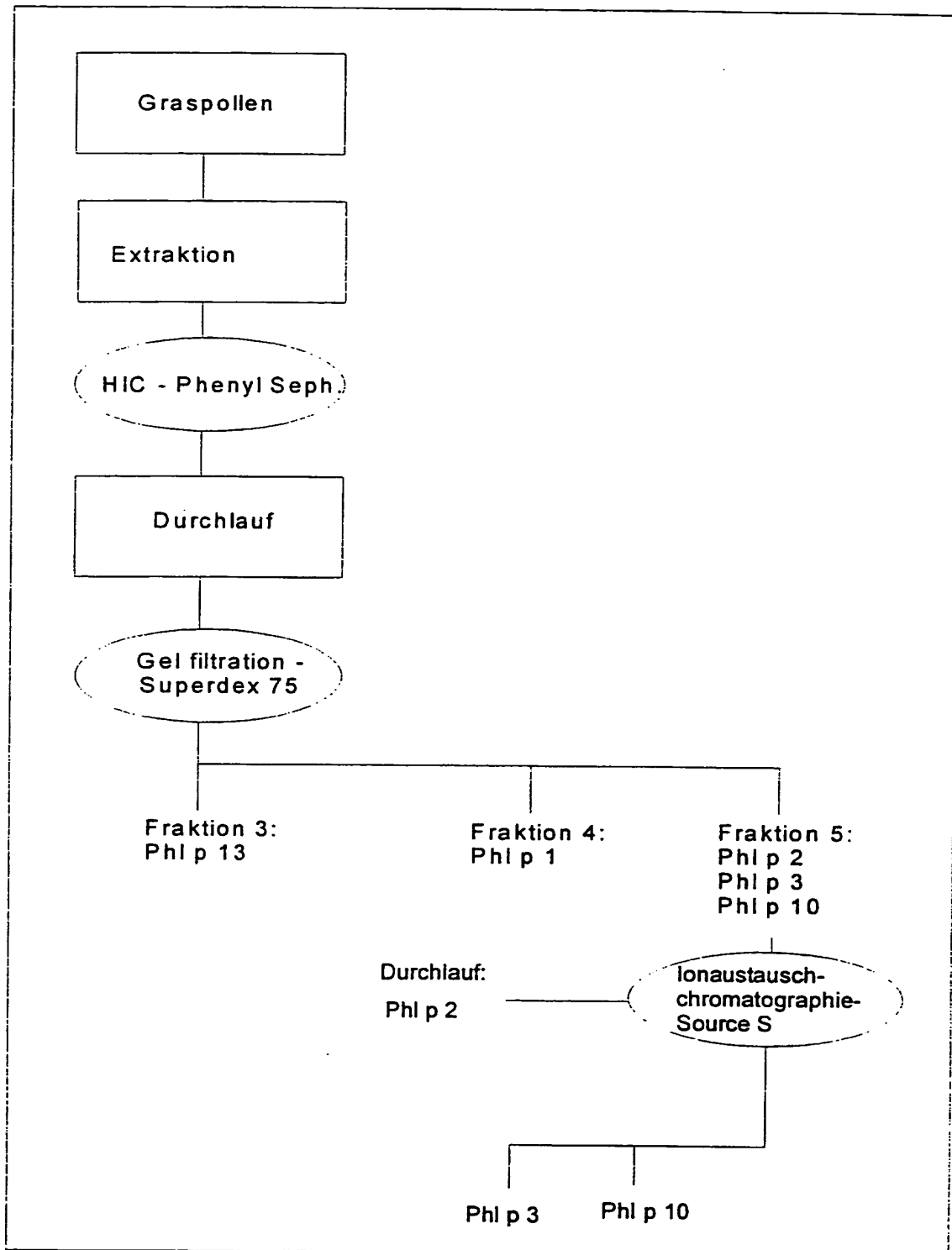
25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von im wesentlich reinen Gras-Allergenen der Gruppen 1, 2, 3, 10, 13, dadurch gekennzeichnet, daß ein wäßriger Extrakt von Pollen der Graminaen hergestellt wird, und die löslichen Bestandteile einer hydrophoben Interaktionchromatographie, einem Gelfiltrations-Schritt und gegebenenfalls einer Kationenaustauscherchromatographie unterzieht .
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Pollen der Spezies *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Holcus lanatus*, *Poa pratensis*, *Secale cereale* zur Extraktion verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Extraktion mittels Tris/HCl-gepufferter wäßriger Lösung erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in einem ersten Schritt mittels hydrophober Interaktions-Chromatographie die Gras-Allergene der Gruppen 1, 2, 3, 10, 13 von anderen Bestandteilen abgetrennt werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Allergene der Gruppe 1 und 13 durch einen nachgeschalteten Gelfiltration-Schritt in separaten Fraktionen erhalten und von den Allergenen der Gruppe 2, 3, und 10 abgetrennt werden.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die nach dem Gelfiltrations-Schritt erhaltenen Allergene der Gruppe 2, 3 und 10 durch eine nachgeschaltete Kationenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden.
7. Verfahren zur Diagnose von Pollenallergien in vivo und in vitro unter Verwendung der gemäß der Ansprüche 1 bis 6 gewonnen Allergene.

8. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend ein oder mehrere nach einem der Ansprüche 1 bis 6 gewonnenen Allergene sowie entsprechende Hilfs- und Trägerstoffe.

1 / 1

Abb 1.:



1
2
3
4

5
6
7
8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/00/08059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/415 A61K39/36 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

A	<p>B FAHLBUSCH ET AL.: "Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography in the purification of major allergens from grass pollen " JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 194, no. 1, 1996, pages 27-34, XP002161720 NEW YORK US</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-8
---	--	-----

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2001

Date of mailing of the international search report

05/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No
/EP 00/08059

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; BOLZACCHINI, EZIO ET AL: "Purification of Phleum pratense pollen extract by immunoaffinity chromatography and high-performance ion-exchange chromatography" retrieved from STN Database accession no. 115:112253 CA XP002161722 & J. CHROMATOGR. (1991), 548(1-2), 229-34 , 1991, abstract</p>	1-8
P,X	<p>R SUCK ET AL.: "Rapid and efficient purification of Phleum pratense major allergens Phl p 1 and group Phl p 2/3 using a two-step procedure" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS., vol. 229, November 1999 (1999-11), pages 73-80, XP002161721 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM., NL ISSN: 0022-1759 the whole document</p>	1-8

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 16 NOV 2001

WIPO

MAR 14 2003

TECH. CENT. 1600/2900

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 9939982-bzrs	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08059	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 18/08/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 24/08/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K39/36		
Anmelder MERCK PATENT GMBH et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 12/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 13.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Montrone, M Tel. Nr. +49 89 2399 8711 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-7 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-8 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08059

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 7.

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 7 in Bezug auf gewerbliche Anwendbarkeit beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08059

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-6
	Nein: Ansprüche	7,8
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-6
	Nein: Ansprüche	7,8
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-6,8
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende **Mängel** aufweist:
siehe Beiblatt

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: J. Immunol. Meth., Bd. 194, 1996, Seiten 27-34

D2: J. Chromatogr., Bd. 548, 1001, Seiten 229-234

Punkt III:

Der Anspruch 7 bezieht sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieses Anspruchs kein Gutachten erstellt (Artikel 34 (4) (a) (i) PCT).

Punkt V:

1. Anspruch 7 bezieht sich auf ein Verfahren zur Diagnose von Pollenallergien in vivo und in vitro unter Verwendung der gemäß Ansprüche 1 bis 6 gewonnen Allergene. Anspruch 8 bezieht sich auf eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend ein oder mehrere nach einem der Ansprüche 1 bis 6 gewonnen Allergene sowie Hilfs- und Trägerstoffe.

D1 beschreibt eine reversed-phase HPLC Reinigung der Hauptallergene der Gruppe 1 und 5 aus Graspollen von *Lolium perenne* und *Phleum pratense* (siehe Zusammenfassung). Zur Identifikation allergener Komponenten werden diese Allergene auf Bindung mit humanem IgE getestet (siehe Seite 29, rechte Spalte, Absatz 1). Diese Allergene werden durch das Verfahren in hohem Maße gereinigt und behalten ihre ursprüngliche Antigenität (siehe Seite 28, linke Spalte, Absatz 1). Da D1 sowohl ein Verfahren zur Bestimmung der Allergenität der gereinigten Pollenallergene beschreibt, sowie die Allergene in gereinigter Form herstellt, wird der Gegenstand der Ansprüche 7 und 8 als nicht neu erachtet (Art. 33(2) PCT).

D2 beschreibt die Reinigung von Hauptallergenen aus *Phleum pratense* Pollen durch

Gelfiltration, Ionenaustausch HPLC und Größenausschluß HPLC oder durch die Verfahrensschritte Gelfiltration, Immunoaffinitätschromatographie und Ionenaustausch HPLC. Die Art der gereinigten Pollenallergene wird nicht genannt.

Damit wird der Gegenstand der Ansprüche 7 und 8 als nicht neu erachtet und erfüllt somit nicht die Anforderungen von Artikel 33 (2) PCT.

2. Der Gegenstand der Ansprüche 1 bis 6 wird jedoch als neu und erfinderisch erachtet, da keines der zur Verfügung stehenden Stand der Technik Dokumente ein Reinigungsverfahren für Pollenallergene bestehend aus hydrophober Interaktionschromatographie, Gelfiltration und gegebenenfalls einer Kationenaustauschchromatographie beschreibt.

Durch dieses Verfahren werden auf einfache Art und Weise Pollenallergene gereinigt, die ihre ursprüngliche Antigenität besitzen. So ein Verfahren wird im Stand der Technik nicht nahegelegt und der Effekt scheint ueberraschend, da eine Trennung der Hauptallergene durch einfache chromatographische Verfahren bislang als nicht durchführbar erachtet wurde (siehe D1, Seite 27, rechte Spalte, Zeile 12 bis Seite 28, linke Spalte, Zeile 4). Das Vorliegen einer erfinderischen Tätigkeit kann somit anerkannt werden (Art. 33(3) PCT).

3. Für die Bewertung der gewerblichen Anwendbarkeit des vorliegenden Anspruchs 7 gibt es keine einheitlichen Kriterien im PCT Verfahren. Die Patentierbarkeit kann von der Formulierung des strittigen Anspruchs abhängen. Das EPA, zum Beispiel, erkennt die gewerbliche Anwendbarkeit eines Anspruchs der sich auf ein therapeutisches Verfahren oder ein Diagnoseverfahren bezieht, das am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen wird, nicht an. Es gestattet aber Ansprüche, die sich auf die erste oder zweite medizinische Verwendung eines bereits bekannten Stoffes zur Herstellung eines neuen Medikaments für eine neue medizinische Behandlung beziehen (siehe Artikel 52 (4) EPÜ und Richtlinien, Kapitel IV, Punkt 4.2).

Punkt VI:

Die Anmelderin wird vorsorglich davon in Kenntnis gesetzt, das daß im

Recherchenbericht als "P" gekennzeichnete Dokument (J. Immun. Methods, Bd. 229, November 1999, Seiten 73-80) schädlich für die Neuheit und die erfinderische Tätigkeit der vorliegenden Anmeldung sein könnte, falls die beanspruchte Priorität nicht gültig ist.

Punkt VII:

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 12 June 2001 (12.06.01)	
International application No. PCT/EP00/08059	Applicant's or agent's file reference 9939982-bzrs
International filing date (day/month/year) 18 August 2000 (18.08.00)	Priority date (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)
Applicant SUCK, Roland et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
12 March 2001 (12.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Eric LESOT (Fax 338.87.40)
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 9939982-bzrs	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08059	International filing date (day/month/year) 18 August 2000 (18.08.00)	Priority date (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/36		
Applicant MERCK PATENT GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 March 2001 (12.03.01)	Date of completion of this report 13 November 2001 (13.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.

PCT/EP00/08059

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-7, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-8, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08059

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 7

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 7 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See Supplemental Sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: **BOX III**

Claim 7 concerns a subject matter which, in the opinion of the Examining Authority, falls under PCT Rule 67.1(iv). Consequently, no opinion is formed with regard to the industrial applicability of the subject matter of this claim (PCT Article 34(4)(a)(i)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

EP 00/08059

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1 - 6	YES
	Claims	7, 8	NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 6	YES
	Claims	7, 8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 6, 8	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: J. Immunol. Meth., Vol. 194, 1996, pages 27-34

D2: J. Chromatogr., Vol. 548, 1001, pages 229-234.

1. Claim 7 concerns a method for diagnosing pollen allergies *in vivo* and *in vitro* using the allergens produced as defined in Claims 1-6. Claim 8 concerns a pharmaceutical composition containing one or more allergens produced as defined in one of the Claims 1-6, as well as auxiliary substances and excipients.

D1 described the reversed-phase HPLC purification of the main allergens of groups 1 and 5 of grass pollen of *Lolium perenne* and *Phleum pratense* (see the abstract). In order to identify allergenic components, the allergens are tested for binding to human IgE (see page 29, right-hand column, paragraph 1). These allergens are purified to a high extent by this method and retain their original antigenicity (see page 28, left-hand column, paragraph 1). Since D1 describes both a method for determining the allergenicity of the purified pollen allergens and produces the allergens in a purified form, the



subject matter of Claims 7 and 8 is not considered novel (PCT Article 33(2)).

D2 describes the purification of main allergens from *Phleum pratense* pollen by gel filtration, ion exchange HPLC and size exclusion HPLC or by the method steps gel filtration, immunoaffinity chromatography and ion exchange HPLC. The type of the purified pollen allergens is not mentioned.

The subject matter of Claims 7 and 8 is therefore not considered novel and thus does not meet the requirements of PCT Article 33(2).

2. However, the subject matter of Claims 1-6 is considered novel and inventive because none of the available prior art documents describes a purification method for pollen allergens comprising hydrophobic interaction chromatography, gel filtration and, if required, cation exchange chromatography.

This method enables pollen allergens that retain their original antigenicity to be purified in a simple manner. The prior art does not suggest such a method, and the effect obtained appears to be surprising because the separation of the main allergens by a simple chromatographic method was until now considered to be impossible (see D1, page 27, right-hand column, line 12 - page 28, left-hand column, line 4). The method can therefore be acknowledged to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

3. In the PCT Contracting States, there are no uniform

criteria for assessing the industrial applicability of Claim 7 in its present form. Patentability can also depend on the wording of the claim in question. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to a therapeutical or diagnostic method practised on the human or animal body; it does, however, allow claims to the first or second medical use of an already known substance in the manufacture of a new drug for a new medical treatment (see EPC Article 52(4) and Guidelines, Chapter IV, 4.2).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

P/EP 00/08059

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: **BOX VI**

The applicant is requested to note that the document designated as a "P" document in the search report (J. Immun. Methods, Vol. 229, November 1999, pages 73-80) could be detrimental to the novelty and inventive step of the present application if the claimed priority should not prove to be valid.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08059

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite document D1 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

